



УДК 547.96 : 541.63

СТЕРЕОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ САМООРГАНИЗАЦИИ
МИОГЛОБИНА

Рашид А. А.

Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино-на-Оке

Проведено стереохимическое исследование самоорганизации миоглобина из α -спиральных участков, определяемых локальными взаимодействиями. На всех стадиях самоорганизации рассматривались только наиболее выгодные плотно упакованные структуры с максимальными дегидратацией массивных гидрофобных групп и числом водородных связей. Показано: 1) для первой половины молекулы простой механизм роста плотно упакованной структуры за счет последовательного изламывания спиралей по обе стороны от Pro^{37} приводит к наиболее выгодным структурам, близким к нативной с различной упаковкой боковых групп в участке BD ; 2) объединение половины молекулы отбирает конформацию пинцетки $G-H$, близкую к нативной; гемовый карман при этом заполняется группами участка CD ; 3) встраивание гема требует нарушения плотной упаковки и конформационной перестройки в области гемового кармана апобелка.

Данная работа, являющаяся продолжением работ [1—2], представляет собой попытку исследовать самоорганизацию миоглобина исходя непосредственно из его первичной структуры.

Ранее [3—4] была рассмотрена грубая модель самоорганизации миоглобина из участков вторичной структуры, локализованной по данным рентгеноструктурного анализа, и показано, что такая модель позволяет получить структуру, близкую к нативной, на двухцентровом пути самоорганизации. В настоящей работе для двухцентрового пути самоорганизации осуществлено стереохимическое исследование самоорганизации молекулы из α -спиралей, определяемых локальными взаимодействиями, которые в случае миоглобина приводят к спиральности любого участка развернутой цепи между двумя пролинами [5—6]. Проверены также использованные в работах [3—4] предположения о возможности: 1) рассматривать самоорганизацию белка как процесс последовательного объединения *только соседних по цепи* структурированных участков; 2) теоретически получать третичную структуру белка на основании рассмотрения только наиболее выгодных промежуточных структур *без полного перебора* всех возможных конформаций белковой цепи.

Известно, что глобулярные белки характеризуются плотной упаковкой боковых групп в гидрофобном ядре [7] и доступностью для воды практически всех свободных доноров и акцепторов водородной связи [8]. Поэтому нами рассматриваются только такие конформации белковой цепи, которые удовлетворяют этим условиям.

Для всех промежуточных и конечных состояний рассматриваются только наиболее выгодные структуры. Наиболее выгодными считаются структуры с максимальным числом дегидратированных массивных гидрофобных

групп (Cys, Met, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp) и максимальным, или отличающимся от максимального не более чем на 2 числом водородных связей атомов основной цепи друг с другом и с короткими боковыми радикалами, а также структуры с числами дегидратированных массивных гидрофобных групп и водородных связей, одновременно меньшими максимальных не более чем на 1. Степень дегидратации массивных гидрофобных групп оценивается визуально с точностью до $\frac{1}{4}$ группы (ср. [2]).

Для решения задачи использовался следующий подход:

1) при помощи «метода разверток» [1] и сборки пространственных моделей проверяли возможность образования плотно упакованных структур из пар соседних по цепи пар α -спиралей от пролина до пролина или из их частей длиной более шести остатков каждая; перебирали все такие структуры и отбирали наиболее выгодные из них; где возможно, осуществляли локализацию концов спиралей, с тем чтобы обеспечить максимальную дегидратацию массивных гидрофобных групп при максимальном числе водородных связей и плотной упаковке;

2) при невозможности плотной упаковки пар спиралей от пролина до пролина по всей их длине для получения выгодных плотно упакованных структур на пространственных моделях вблизи области нарушения плотной упаковки проводились изломы спиралей и (или) искажения регулярной системы водородных связей; по возможности полный перебор структур проводился при помощи моделей СРК [9];

3) при помощи пространственных моделей исследовали возможность образования единой компактной глобулы и встраивания в нее гема.

Пролины разбивают цепь миоглобина на четыре длинных спиральных участка: участок \overline{AB} , включающий в себя нативные спирали A и B ; участок \overline{CE} , включающий нативные спирали C , D , E ; участки \overline{G} и \overline{H} , включающие в себя нативные спирали \overline{G} и \overline{H} (локализация концов этих участков* может отличаться от нативной), и один короткий участок в районе нативной спирали F . Соседние по цепи длинные спиральные участки миоглобина могут образовывать упаковки только антипараллельного типа, так как отсутствуют достаточно длинные фрагменты между спиральями, необходимые для образования упаковок параллельного типа.

Исследование методом разверток, описанным нами в работах [1–2], показывает невозможность образования плотно упакованной по всей длине шпильки из спиралей \overline{AB} и \overline{CE} . При любой попытке получить выгодную плотную упаковку полярные радикалы Lys⁵⁰ или Glu⁵⁴ попадают во внутреннюю впадину на месте Gly²⁵ ($B6$), что противоречит условию доступности для воды свободных доноров и акцепторов водородной связи этих групп. Для спиралей \overline{G} и \overline{H} методами, описанными в работе [2], удалось найти окрестности трех различных наиболее выгодных плотно упакованных структур с дегидратацией ~ 6 массивных гидрофобных групп, причем каждая из окрестностей соответствует набору конформаций, различающихся поворотными изомерами отдельных боковых групп и смещениями спиралей в пределах 2–3 Å. Всего для шпильки $\overline{G} - \overline{H}$ было получено перебором на развертках и детально проанализировано 10 таких наборов [2].

Из-за невозможности образования плотно упакованной по всей длине шпильки из спиралей \overline{AB} и \overline{CE} для первой половины молекулы рассматривались два альтернативных пути самоорганизации: 1) спирали \overline{AB} и \overline{CE} складываются в плотно упакованную структуру, начиная с излома между ними, определяемого Pro³⁶, с последующими изломами спиралей в областях нарушения плотной упаковки по обе стороны от него; 2) образуется шпилька $\overline{A} - \overline{E}$ с большой спиральной петлей \overline{AE} , которая затем встраивается, приобретая плотную упаковку.

* Обозначены черточкой над соответствующей буквой.

При рассмотрении первого пути, ввиду отсутствия алгоритма полного перебора структур на пространственных моделях, предпринята попытка сделать перебор по возможности полным с помощью введения следующих правил и ограничений:

1) С-конец участка 1—36 имеет систему водородных связей α -спирали;

2) следующий участок имеет также α -спиральную конформацию, и локализация его С-конца определяется условиями плотной упаковки массивных гидрофобных групп Phe⁴³, Phe⁴⁶, Leu⁴⁹;

3) перебор упаковок следующего сегмента молекулы проводится при четырех различных взаимных расположениях остатков Leu³², Phe³³ и Leu⁴¹, допускающих участие Leu⁴¹ (C5) в плотной упаковке гидрофобного ядра (рис. 1);

4) система водородных связей поддерживается максимальной с внешним искажением в исходную α -спираль, если этого требуют условия дегидратации и плотной упаковки;

5) $i + 1$ -й излом спирали проводится только для наиболее выгодных конформаций с i -изломами.

На рис. 2, $a - e$ даны матрицы контактов (т. е. расстояний между неводородными атомами боковых цепей, меньших 5Å) и системы водородных связей для окрестностей шести наиболее выгодных из найденных конформаций фрагмента 25—59. В этих конформациях, большинство которых относится к области СII (рис. 1), локализация С-конца С-спирали определяется однозначно условиями дегидратации и плотной упаковки. Попытка включить Phe⁴³ в С-спираль так, чтобы его СО- и NH-группы оказались включенными в систему водородных связей спирали, приводит к уменьшению дегидратации на 1,5—3 группы. При удлинении участка CD за счет С-спирали Phe⁴³ и (или) Leu⁴⁰ становятся доступными для воды; добиться при этом увеличения числа водородных связей не удается.

Таким образом, во всех полученных выгодных структурах СО-группа Phe⁴³ участвует в системе водородных связей участка CD, а его NH-группа либо остается свободной, либо участвует в системе водородных связей участка С. Следующий излом в различных конформациях может варьировать в пределах ± 1 остаток от положения 51. В упаковках В — С — D III и В — С — D IV (рис. 2, $e - z$) излом CD — D определяется однозначно условием дегидратации Met⁵⁵ и ограничениями, накладываемыми непрерывностью полипептидной цепи.

Упаковки В — С — DI, В — С — DII, В — С — DVI оказываются невыгодными для присоединения следующего участка спирали (\bar{E}). Присоединение \bar{E} -спирали к упаковкам В — С — DIII и В — С — DIV однозначно определяется комплементарностью впадин на спиральях \bar{B} и \bar{E} в области Gly²⁵ и Gly⁶⁵. Локализация излома DE в образующихся конформациях определяется, кроме того, условиями дегидратации Met⁵⁵, непрерывностью полипептидной цепи и образованием водородной связи между кислородом боковой цепи остатка Ser⁵⁸ и NH-группой основной цепи остатка Leu⁶¹, который иначе оказывается трудно доступным для воды. Возможно, хотя и с напряжением, удлинение D-спирали на остаток Ser⁵⁸. Напряженная упаковка В — С — DV оказывается тушкой из-за невозможности образования выгодной шпильки $\bar{A} - \bar{E}$, так же как и ряд других не приведенных здесь структур.

Остаток Val²¹ (B2) участвует в плотной упаковке с группами \bar{E} -спирали в структурах В — С — DIII и В — С — DIV, поэтому излом спирали $\bar{A}\bar{B}$ происходит перед ним. Условия гидратации полярных групп в изломе определяют систему водородных связей, близкую к нативной [10], а условия плотной упаковки — окрестность конформации $\bar{A}\bar{E}II$ для шпильки ($\bar{A} - \bar{E}$ (см. [2]). Матрица контактов одной из двух полученных конформаций первой половины молекулы дана на рис. 3.

Изменение дегидратации и числа выгодных конформаций при увеличении структуры происходит следующим образом. Для фрагмента В — С —

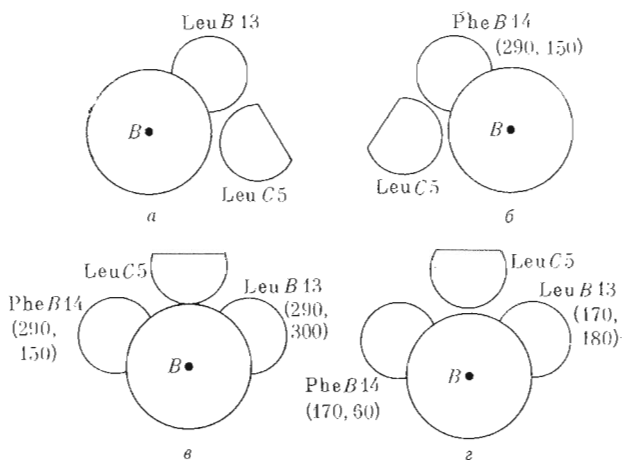


Рис. 1. Четыре различных положения C -спирали относительно B -спирали: a — область $C1$; b — область CII ; v — область $CIII$; z — область CIV

D имеется довольно много сравнимых по выгодности конформаций с 11—13 водородными связями в участке $C — D$ и дегидратацией $4^{3/4} — 5^{1/2}$ массивных гидрофобных групп. Присоединение спирали \bar{E} возможно к нескольким конформациям, это приводит к сравнимым по выгодности структурам с дегидратацией $8 — 8^{1/4}$ массивных гидрофобных групп. В свою очередь спираль \bar{A} может присоединиться только к двум из найденных конформаций, отличающимся друг от друга лишь упаковкой боковых групп во фрагменте $B — C — D$ при примерно одинаковом ходе основной цепи; в результате образуются две конформации с одинаковой шпилькой $A — \bar{E}$ и дегидратацией $12^{1/2}$ массивных гидрофобных групп.

Исследование второго пути показало, что при изламывании спирали \overline{CE} перед началом E -спирали появляется возможность образования плотно упакованной шпильки $\bar{A} — \bar{E}$, причем остаток Val²¹ ($B2$) может быть включен в область плотной упаковки на продленной спирали A (см. [2]). Для шпильки $\bar{A} — \bar{E}$ были найдены окрестности двух наиболее выгодных плотно упакованных структур с дегидратацией 5—6 массивных гидрофобных групп, однако получить плотно упакованную структуру с меньшим, чем в нативной, числом изломов не удалось. Не удалось также получить плотно упакованную структуру путем последовательного изламывания спиралей \overline{AB} и \overline{CE} . Полученные результаты не противоречат возможности самоорганизации участка AE из неструктурированной петли после образования шпильки $\bar{A} — \bar{E}$, но рассмотрение такого пути самоорганизации при помощи моделей пока технически трудно осуществимо.

Образование единой глобулы из полученных половин молекулы может происходить шестью различными способами, при каждом из которых одна из двух наиболее выгодных структур первой половины молекулы объединяется с одной из трех наиболее выгодных структур [2] второй ее половины. Структура GHI второй половины молекулы отличается от структур $GIII$ и $GIII$ не только упаковкой боковых групп, но и знаком угла $180^\circ — \alpha$, где α — угол между положительными направлениями осей входящих в шпильку спиралей. Анализ сборки единой глобулы показал, что при объединении любой из двух структур первой половины молекулы со структурами $GIII$ или $GIII$ в области остатков Val A15, His B5, Asp B8 и Ile B9 образуется гидрофобная полость, близкая по размерам боковой группе Phe. При объединении любой из двух наиболее выгодных структур первой половины молекулы со структурой GHI шпильки $G — H$

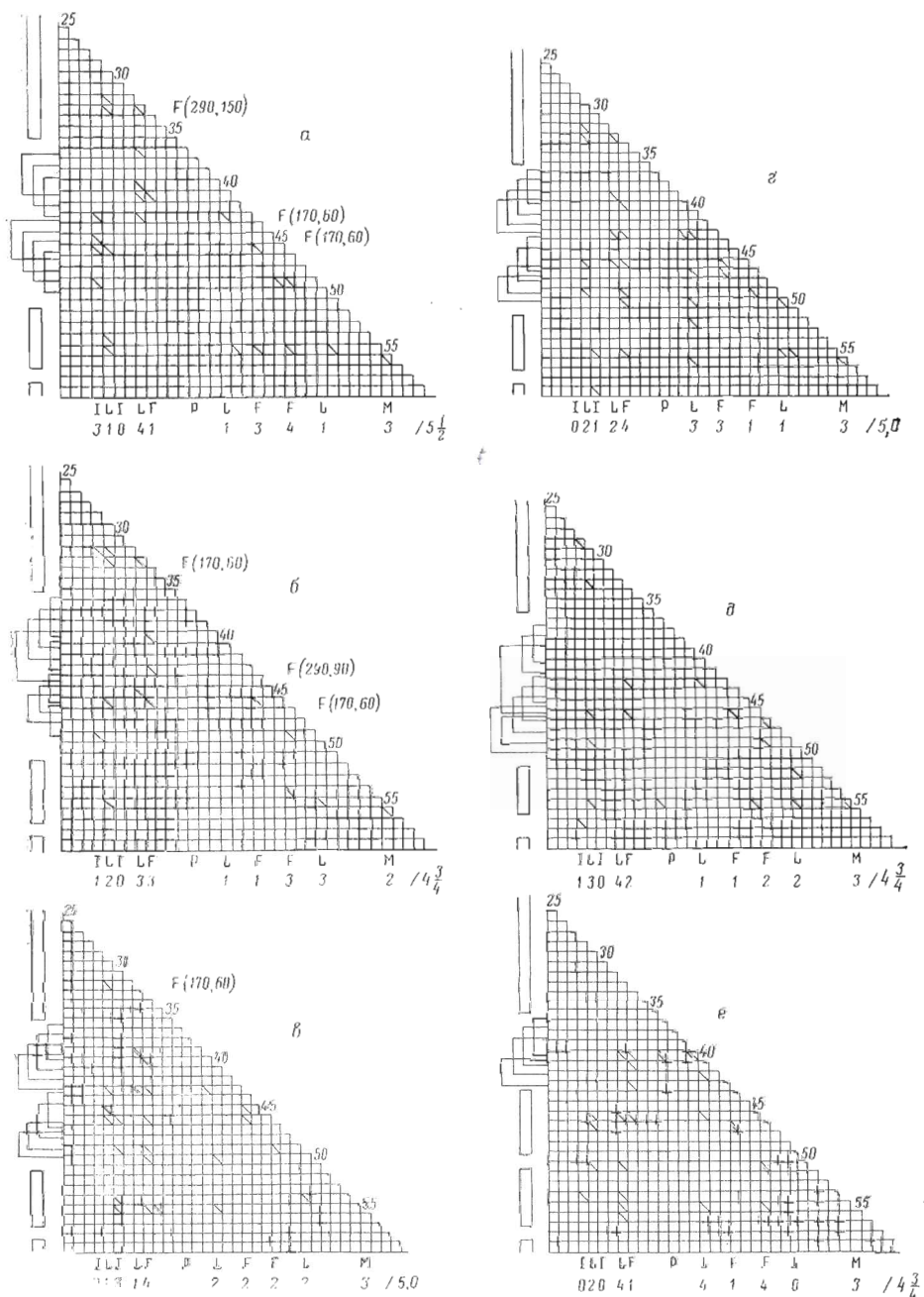


Рис. 2. Матрицы контактов шести наиболее выгодных структур участка $B - C - D$: а — $B - C - DI$, б — $B - C - DII$, в — $B - C - DIII$, г — $B - C - DIV$, д — $B - C - DV$, е — $B - C - DVI$. Приведены системы водородных связей в спиральях (прямоугольниками обозначены регулярные α -спирали), суммарная степень дегидратации и дегидратация каждой гидрофобной группы (в четвертях ее поверхности)

такой полости не образуется, а гемовый карман при этом почти полностью заполняется боковыми группами участка CD . Для встраивания гема требуется предварительное раздвигание половин молекулы в области гемового кармана и перестройка участка CD в менее выгодную по числу водородных связей конформацию. Встраивание гема приводит к дополнительной дегидратации 1,5—2 массивных гидрофобных групп. Из-за технических

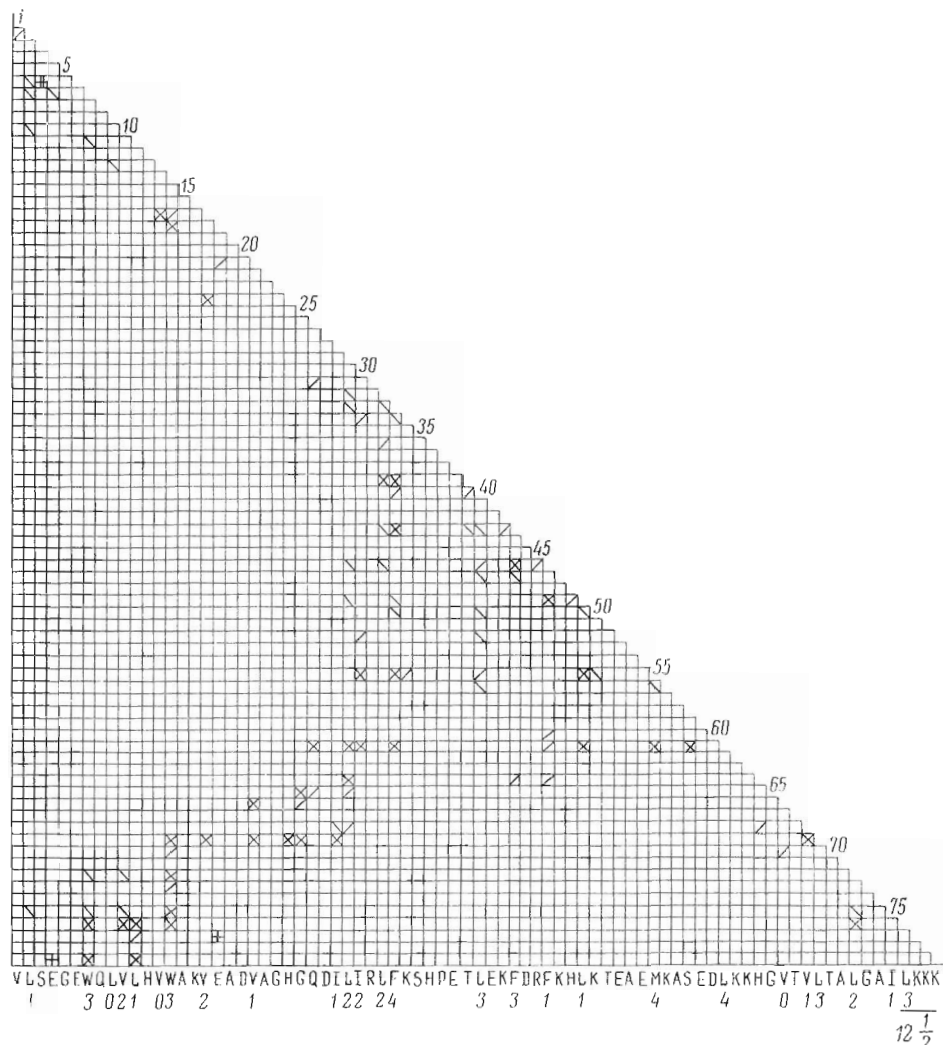


Рис. 3. Матрица контактов одной из двух наиболее выгодных структур первой половины молекулы. \ — наличие контакта в собранной модели; / — наличие контакта в нативной структуре; | — водородная связь между боковыми цепями в модели; — — водородная связь «основная цепь — боковая цепь» в модели; +, -, # — те же связи в нативной структуре

трудностей (в частности, веса моделей) точность построения моделей при рассмотрении объединения двух половин молекулы существенно меньше точности построения шпильки (2—3Å, [2]).

Исследование самоорганизации первой половины молекулы показывает, во-первых, что простой механизм роста структуры путем последовательного присоединения соседних по цепи структурированных участков и отбора наиболее выгодных структур (ср. [3—4]) дает удовлетворительный результат и позволяет с точностью до одного остатка (так же как и для шпильки *G — H* [2]) локализовать концы спиральных участков в процессе роста структуры. Во-вторых, рост первой половины молекулы, как и формирование шпильки *G — H* [2], свидетельствует о частично направленном характере процесса самоорганизации [11]. В-третьих, наличие по крайней мере двух альтернативных конформаций участка *CD* с большим на две-три, чем в нативном состоянии, числом водородных связей говорит о необходимости перестройки наиболее выгодных конформаций этого участка при присоединении гема, что подтвердится исследованием объеди-

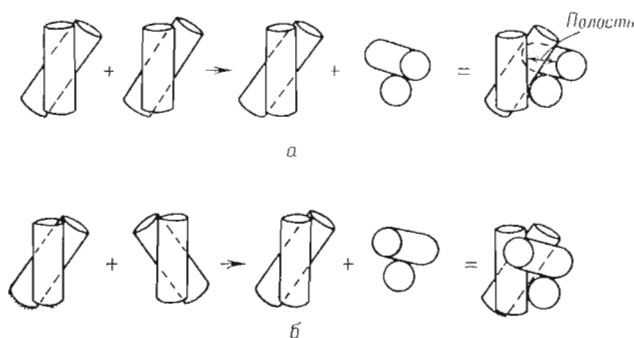


Рис. 4. Схема крестообразной упаковки двух спижек с малыми углами между осями образующих их цилиндров; *a* — идентичные спижки с $\alpha_1 = \alpha_2$, не допускающие плотной упаковки; *b* — спижки с противоположным знаком α , допускающие плотную упаковку

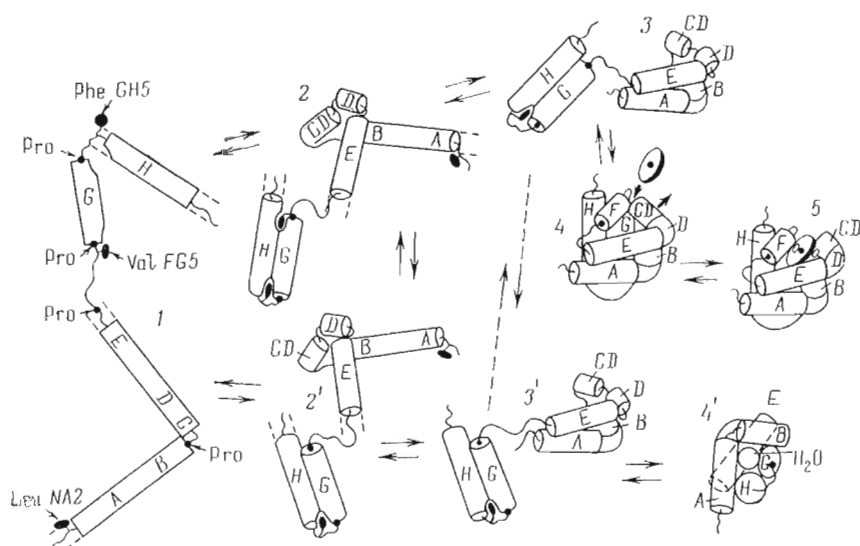


Рис. 5. Схема исследованного в работе пути самоорганизации молекулы миоглобина. Промежуточные структуры отмечены цифрами. Промежуточные структуры на тушковой ветви пути обозначены цифрами со штрихом. В структуре 4 указано направление смещения участка *CD* при встраивании гема. Стрелками указаны направления возможных конформационных переходов

нения двух половин молекулы. Это указывает на то, что встраивание гема, вероятно, связано с переходом через энергетический барьер. Оценка различий в стабильности белка и алобелка по разнице в степени дегидратации находится в удовлетворительном согласии с экспериментальными данными по дейтериеобмену [12]. Образование структуры с заполненным гемовым карманом также согласуется с экспериментальными данными по мутантным гемоглобинам [13], хотя возможно, что из-за необходимости встраивания гема участок гемового кармана должен обладать пониженной стабильностью и быть подверженным тепловым флуктуациям. И наконец, более плотное, чем в случае *GHII* и *GHIII*, присоединение структуры *GH I* к первой половине молекулы объясняется, по-видимому, простым геометрическим фактом. Для спижек из цилиндров с небольшим углом α между их осями плотная упаковка двух спижек перпендикулярно друг другу

возможна, если угол α (или $\alpha - 180^\circ$ для шпилек антипараллельного типа) имеет для двух шпилек противоположный знак, и невозможна, если знак угла α для них одинаков (рис. 4). Результаты стереохимического анализа самоорганизации миоглобина суммированы в рис. 5.

Таким образом, в настоящей работе и работе [2] впервые проведен анализ самоорганизации высокоспиральной белковой молекулы с локализацией спиральных участков в ходе этого процесса и уточнены конкретные механизмы такой локализации. Используемые в работе методы позволили теоретически получить структуру миоглобина с разрешением $\sim 5\text{Å}$, а структуру спиральных шпилек — с разрешением 2—3 Å, причем нативная структура половины молекулы совпадает в указанном разрешении с одной из двух-трех наиболее выгодных структур. Несмотря на сложность, выявившиеся в процессе работы (самая серьезная из них — отсутствие алгоритма полного перебора плотно упакованных структур для фрагментов с большим числом степеней свободы), полученные результаты, находящиеся в согласии с результатами грубой модели [3—4], позволяют надеяться на успех в теоретическом исследовании самоорганизации методом последовательных приближений. Мы думаем, что комбинация методов, использованных в настоящей работе, с расчетами конформационной энергии [14] приведет к возможности теоретического получения с помощью ЭВМ структуры высокоспиральных белков типа глобинов с высоким разрешением.

Автор благодарит О. Б. Птицына за полезные дискуссии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рашин А. А. (1976) Биоорган. химия, 2, 655—665.
2. Рашин А. А. (1976) Биоорган. химия, 2, 666—679.
3. Птицын О. Б., Рашин А. А. (1973) Докл. АН СССР, 213, 413—416.
4. Ptitsyn O. B., Rashin A. A. (1975) Biophys. Chem., 3, 1—20.
5. Девесюк А. И., Птицын О. Б., Финкельштейн А. В. (1974) Биофизика, 19, 549—561.
6. Finkelstein A. V., Ptitsyn O. B. (1976) J. Mol. Biol., in press.
7. Lee B., Richards F. M. (1971) J. Mol. Biol., 55, 379—400.
8. Blow D. M., Steitz T. A. (1970) Ann. Rev. Biochem., 39, 63—100.
9. Koltun W. L. (1965) Biopolymers, 3, 665—679.
10. Watson H. C. (1968) Progr. Stereochem., 4, 299—333.
11. Ristow S. S., Wetlaufer D. B. (1973) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 50, 544—550.
12. Abrash H. J. (1970) Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 37, 199—244.
13. Greer J. (1971) J. Mol. Biol., 59, 107—126.
14. Nakata Y., Suzuki K. (1975) Polym. J., 7, 444—448.

Поступила в редакцию
4.III.1976

STEREOCHEMICAL STUDY OF MYOGLOBIN SELF-ORGANIZATION

RASHIN A. A.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

A stereochemical study of myoglobin self-organization from α -helices determined by local interactions has been carried out. Only most favourable tightly packed structures with maximal dehydration of bulky hydrophobic groups and maximal number of hydrogen bonds have been considered at all the stages. It has been shown that: 1) for the first half of the molecule a simple mechanism of tightly packed structure growth at the expense of consecutive bending of helices on both sides of Pro³⁷ leads to the most favourable conformations which are close to the native one and have different packing at the *B-D* region; 2) on association of the two halves of the molecule the conformation of the *C-H* hairpin close to the native one is being chosen, whereby the haem pocket is filled with groups of the *CD* region; 3) the haem building-in requires disruption of the tight packing and needs conformational changes in the region of haem pocket of apoprotein.